

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ
И СИСТЕМЫ ЖИЗНЕОБЕСПЕЧЕНИЯ

УДК 543.544.5.068.7

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ДОЦЕТАКСЕЛА В СОСТАВЕ ПОЛИМЕРНОЙ КОМПОЗИЦИИ МЕТОДОМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© 2022 г. С. В. Алешин¹*, В. В. Заварзина¹, С. Л. Кузнецов¹,
И. А. Тубашева¹, Н. В. Гукасова¹, Ю. И. Полтавец¹

¹ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: neos.1991@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2021 г.

После доработки 17.01.2022 г.

Принята к публикации 24.01.2022 г.

Представлены результаты разработки и валидации методики количественного определения доцетаксела в полимерной композиции для молекулярно-прицельной терапии на основе сополимера молочной и гликолевой кислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил от 4.25 до 425.06 мкг/мл доцетаксела в растворе.

DOI: 10.56304/S2782375X22010041

ВВЕДЕНИЕ

В ряду лекарственных веществ (ЛВ) противоопухолевого действия важное место занимает доцетаксел (DTX) — полусинтетический алкалоид из группы таксанов (рис. 1) [1]. Оригинальным препаратом на основе DTX является Таксотер (Sanofi-Aventis) [2].

Препараты доцетаксела применяются при монотерапии различных видов злокачественных новообразований — рака молочной железы, яичников, легких, простаты и др. В некоторых схемах лечения используются комбинации DTX с другими противоопухолевыми ЛВ (фторурацил, цисплатин, гемцитабин и пр.). Лечение DTX может вызывать различные побочные токсические эффекты: анемию, нейтропению, лейкопению, тошноту, рвоту, стоматит и пр. [3–5].

Для повышения эффективности и уменьшения токсического действия препаратов DTX разрабатываются различные системы доставки, в том числе адресного (таргетного) действия [6]. Избирательность доставки ЛВ в подобных системах увеличивается за счет наличия в них векторных молекул (векторов), обладающих специфическим сродством к поверхностным рецепторам опухолевых клеток. Одним из таких векторов является фолиевая кислота, а также ее производные [7, 8].

В ряду систем доставки ЛВ заметную роль играют полимерные частицы на основе полилактидгликолидов — сополимеров молочной и гли-

колевой кислот (PLGA) [9, 10]. Они характеризуются биосовместимостью, биоразлагаемостью, отсутствием токсичности, обеспечивают пролонгированное действие ЛВ [11–13].

Ранее была разработана полимерная композиция (комплекс) для молекулярно-прицельной терапии, содержащая DTX, на основе частиц PLGA, модифицированных производным фолиевой кислоты (ПКМПТ-Д) [14, 15]. Показаны высокая цитотоксическая активность данной полимерной композиции в отношении опухолевых клеток в исследованиях *in vitro* [16] и хорошая переносимость в токсикологических исследованиях на животных [17] по сравнению с DTX (субстанцией). В [18] изучались устойчивость композиции к гамма-облучению и стабильность в процессе хранения.

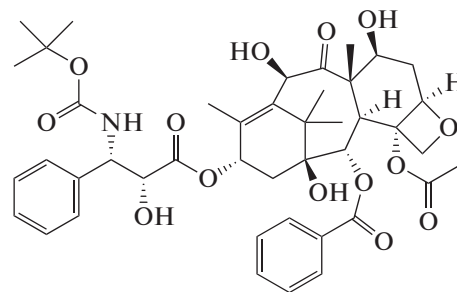


Рис. 1. Структурная формула доцетаксела.

Цель настоящего исследования – разработка и валидация методики количественного определения доцетаксела с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (**ВЭЖХ-УФ**) в полимерной композиции на основе частиц PLGA.

МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись образцы экспериментальной полимерной композиции DTX, представляющей собой лиофилизат для приготовления суспензии, состав которой представлен в табл. 1. В работе также использовались “холостые” образцы, содержащие те же вспомогательные компоненты полимерной композиции, но без действующего вещества DTX.

Хроматографическое разделение проводили при помощи системы Agilent 1200 Series, оснащенной диодно-матричным детектором G1315C, бинарным двуканальным насосом G1312B, ауто-семплером G1367C, дегазатором, термостатом колонок (Agilent Technologies, США). Обработку данных выполняли, используя программное обеспечение Agilent ChemStation, ver. B 04.03 SP 1 (Agilent Technologies, США). Применяли хроматографические колонки с обращенной фазой: Kromasil® 100-5-C18 4.6 × 250 мм (Nouryon, Швеция) и Agilent Eclipse XDB-C18 5 мкм 4.6 × 250 мм (Agilent Technologies, США). Образцы взвешивали на весах GR-202, дискретность – 0.01 мг, максимальная нагрузка – 210 г (A&D, Япония). Отмеривание жидкостей (растворителей, растворов) проводили пипеточным одноканальным дозатором переменного объема 100–1000 мкл Ленпипет Техно, Thermo Scientific (Россия). Вспомогательное оборудование: шейкер вибрационного типа Vortex (ELMI, Латвия); центрифуга Eppendorf 5424 R (Eppendorf, ФРГ); лабораторная система водоподготовки Milli-Q Integral S. Kit (Millipore, Франция); колбы мерные 1 класса точности вместимостью 10 и 200 мл, соответствующие ГОСТ 1770-74 (Shott Duran, ФРГ).

Стандартный образец: доцетаксел безводный (Docetaxel Anhydrous), чистота 99.72% (Xi'an Terra Biochem Co. Ltd., Китай). Растворители: ацетонитрил, класс HPLC-gradient (Panreac Quimica S.L.U, Испания); диметилсульфоксид (ДМСО), х.ч. (Компонент-реактив, РФ); метанол, класс HPLC (Macron, Польша); кислота уксусная ледяная, х.ч. (Компонент-Реактив, РФ); вода очищенная (Milli-Q).

Метод ВЭЖХ

Приготовление растворителя. В мерную колбу объемом 200 мл помещали 100 мл воды Milli-Q, прибавляли 0.1 мл кислоты уксусной ледяной, до-

Таблица 1. Состав полимерной композиции доцетаксела

Наименование компонента	Содержание, мас. %
Доцетаксел	2.4–2.8
Полимер PDLG 5004	47.9–57.8
Поливиниловый спирт	20.0–26.0
Производное фолиевой кислоты*	0.04–0.06
Натрия хлорид	18.0–25.0

*Смесь α- и γ-додециламидов фолиевой кислоты.

водили объем до метки ацетонитрилом, тщательно перемешивали.

Приготовление подвижной фазы. В качестве компонента А использовали воду Milli-Q, компонента Б – ацетонитрил. Компоненты А и Б подвижной фазы дегазировали и фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0.45 мкм.

Приготовление стандартного раствора DTX. Около 20 мг стандартного образца DTX (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в 1 мл метанола, доводили до метки метанолом, тщательно перемешивали. Полученный раствор в количестве 1 мл помещали в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляли 1 мл ДМСО, доводили объем до метки растворителем (приготовление растворителя дано выше), тщательно перемешивали.

Приготовление испытуемого раствора. Около 20 мг испытуемого образца (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 10 мл, растворяли в 1 мл ДМСО, затем доводили до метки растворителем, тщательно перемешивали. Полученный раствор в количестве 2 мл центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об./мин, после этого 1.5 мл осветленного раствора переносили в виалу для хроматографирования.

Приготовление бланк-раствора. В мерную колбу объемом 10 мл загружали 1 мл ДМСО, доводили объем до метки растворителем, тщательно перемешивали.

Выполнялись следующие хроматографические условия:

- колонка Kromasil® 100-5-C18, 100 А, 5 мкм, 4.6 × 250 мм;
- температура колонки 35 ± 1°C;
- детектор УФ-спектрофотометрический, длина волны – 232 нм;
- скорость потока 1.2 мл/мин;
- подвижная фаза: компонент А – вода MilliQ, компонент Б – ацетонитрил;
- режим элюирования градиентный (схема градиентного элюирования представлена в табл. 2);

Таблица 2. Схема градиентного элюирования

Время, мин	Содержание компонента А в подвижной фазе, об. %
0	72
9	72
39	28
50	72

- объем пробы 25 мкл;
- время удерживания ДТХ ~ 28 мин, ДМСО ~ 3 мин;
- время хроматографирования 50 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия: относительное стандартное отклонение (**RSD**, %) площади пика ДТХ, рассчитанное по пяти хроматограммам стандартного раствора, не должно превышать 2%; эффективность колонки (*N*), рассчитанная по пику ДТХ, должна быть не менее 10000 теоретических тарелок, фактор симметрии пика ДТХ должен составлять не менее 0.7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

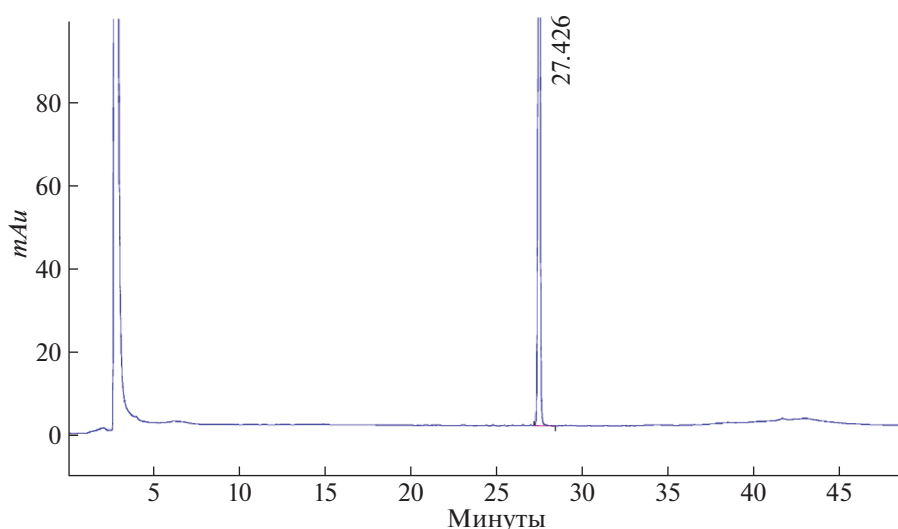
При разработке методики количественного определения ДТХ в составе полимерной композиции за основу были взяты условия хроматографирования методом ВЭЖХ-УФ из Европейской Фармакопеи (Docetaxel Trihydrate, monograph 2449) [19]. Использованный метод пробоподготовки с применением ДМСО обеспечил полное растворение и возможность последующего количественного переноса пробы в процессе получения аналитической концентрации ДТХ в раство-

ре исследуемого образца, а низкое значение рН анализируемого раствора положительно сказывалось на эффективности разделения и показателе симметрии пика ДТХ на хроматограмме.

Валидация осуществлялась в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 “Валидация аналитических методик” Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ XIV) [20]. Полученные результаты показали пригодность разработанной методики для решения поставленных задач.

Специфичность аналитической методики характеризует ее способность однозначно оценивать определяемое вещество в присутствии сопутствующих компонентов [20]. Для установления *специфичности* анализировали стандартный образец ДТХ, образцы полимерной композиции, содержащие ДТХ, “холостые” образцы полимерной композиции, не содержащие действующего вещества. Анализировали также образцы полимерной композиции ДТХ, подвергшиеся гамма-облучению, полученные в [18] при проведении исследований на стабильность, с целью получения характеристик хроматографического разделения ДТХ и примесей (продуктов распада). На хроматограммах стандартного и испытуемого растворов время удерживания ДТХ совпадало и составляло ~27.5 мин (рис. 2, 3). На хроматограммах растворов “холостых” образцов пики со временем удерживания ДТХ отсутствовали (рис. 4). На хроматограммах растворов испытуемых образцов, содержащих пики ДТХ, а также примеси, наблюдалось их полное разделение (рис. 5).

Линейность методики характеризуется наличием линейной зависимости величины площади пика на хроматограмме от концентрации определяемого вещества в анализируемом образце в

**Рис. 2.** Хроматограмма раствора стандартного образца доцетаксела.

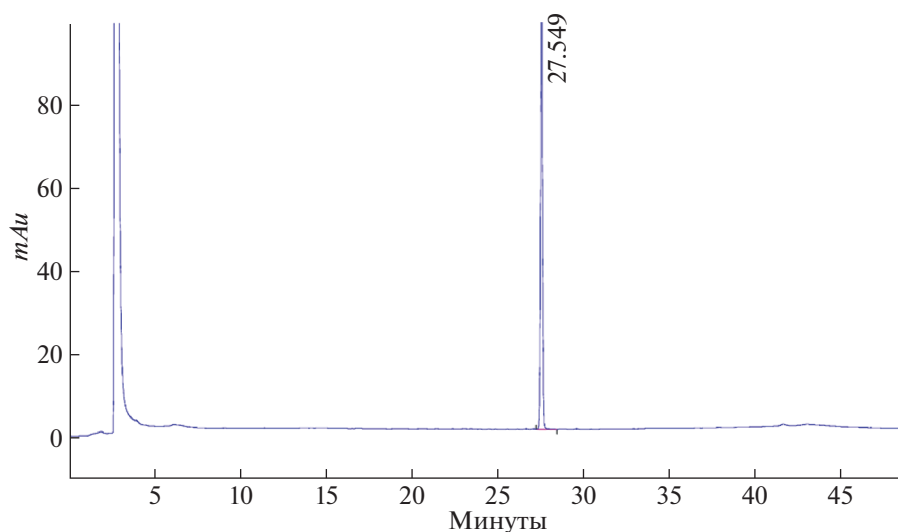


Рис. 3. Хроматограмма раствора полимерной композиции, содержащей доцетаксел.

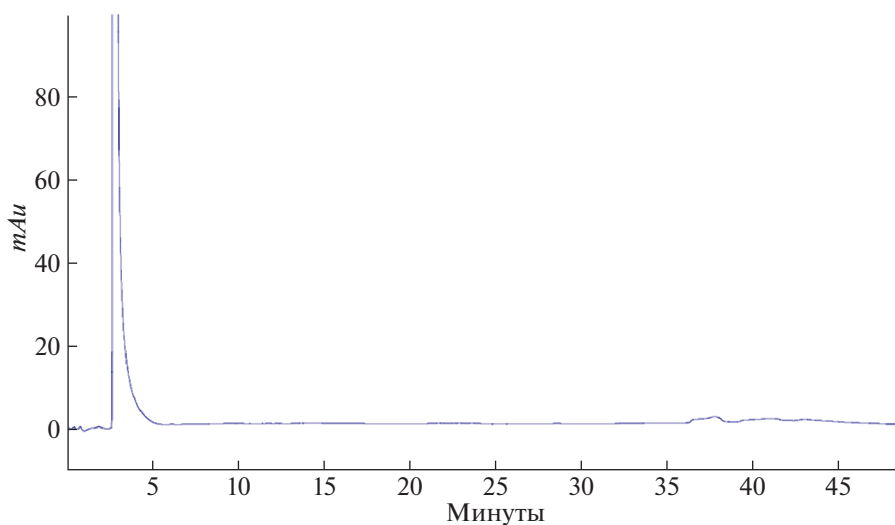


Рис. 4. Хроматограмма раствора "холостого" образца полимерной композиции (содержание доцетаксела 0%).

пределах *аналитической области*. Аналитическая область (аналитический диапазон) методики, для которой была подтверждена линейность, составила от 4.25 до 425.06 мкг/мл DTX в растворе, что соответствует его содержанию в исследуемом образце от ~0.2 до 20 мас. % (табл. 3). Полученный график линейной зависимости описывается уравнением $y = 16.564x + 13.843$, параметр r^2 равен 0.9999 (рис. 6). Отклонение рассчитанной концентрации калибровочного раствора DTX от фактического значения укладывалось в норму (модуль значений отклонения для пяти точек не превышал 2%). Ожидаемое содержание DTX в образцах полимерной композиции находилось в диапазоне от 2 до 6%, в испытуемых образцах оно составляло от 2.4 до 2.8% (табл. 1). Таким обра-

зом, найденный аналитический диапазон соответствует требованиям, предъявляемым к разработанной методике.

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [20]. Для оценки правильности рассчитывалась относительная ошибка (E , %) отдельного определения для трех различных концентраций стандартного раствора (низкой, средней, высокой), по пять анализов для каждой концентрации. Полученные значения модуля величины E не превышали 2%, что соответствует норме (табл. 4).

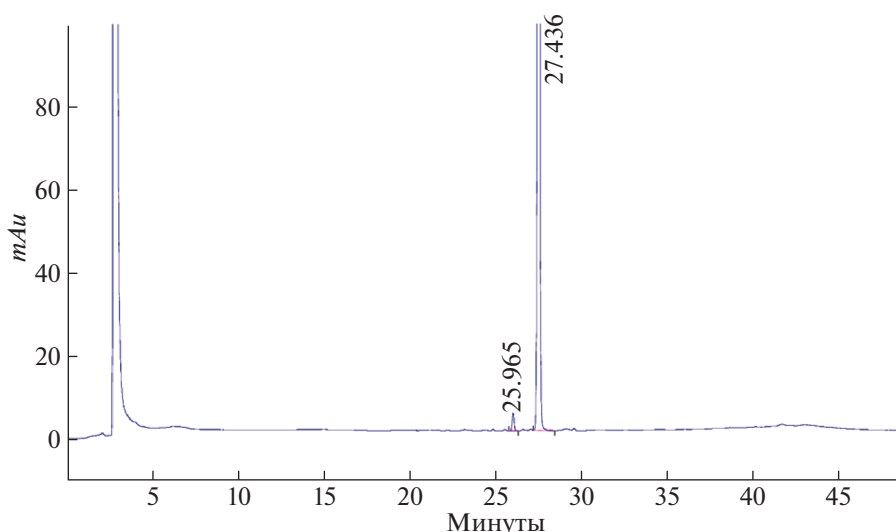


Рис. 5. Хроматограмма раствора полимерной композиции доцетаксела, содержащей примесь (продукт разложения).

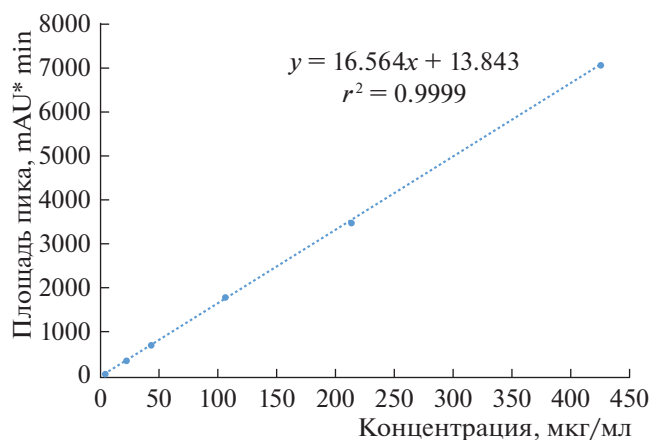


Рис. 6. Калибровочный график зависимости величины площади хроматографического пика доцетаксела от концентрации в растворе.

Прецизионность методики оценивали как повторяемость (сходимость). Для полученных значений трех различных концентраций стандартного раствора (по пять анализов для каждой кон-

центрации) были рассчитаны величины RSD. Полученные значения составили не более 2%, что находится в пределах нормы. Результаты определения правильности и прецизионности методики представлены в табл. 4.

Предел количественного определения (ПКО) методики определяли на основании данных линейности и прецизионности. За ПКО методики принимали минимальную концентрацию DTX в растворе, для которой возможно определение DTX со значениями относительного стандартного отклонения не более 2% в диапазоне линейной зависимости. ПКО методики составил 4.25 мкг/мл (соответствует ~0.2% действующего вещества в испытуемом образце). Хроматограмма стандартного раствора DTX в концентрации, соответствующей ПКО, приведена на рис. 7.

Для оценки *устойчивости (робастности)* методики (степени ее чувствительности к влиянию небольших изменений в параметрах, способных возникнуть при практическом использовании) провели исследование стандартного раствора DTX с использованием двух обращенно-фазовых хроматографических колонок разных производи-

Таблица 3. Оценка линейности методики определения доцетаксела

Концентрация стандартного раствора, мкг/мл	Концентрация стандартного раствора (рассчитанная), мкг/мл	Отклонение, %
425.06	425.93	0.20
212.53	209.86	-1.27
106.27	107.89	1.50
42.51	43.01	1.16
21.25	21.16	-0.43
4.25	3.99	-6.52

Таблица 4. Оценка правильности и прецизионности методики определения доцетаксела

Содержание доцетаксела в образце			SD* ($n = 5$)	RSD** ($n = 5$), %	E***, %
введено, %	найдено, %	найдено среднее значение ($n = 5$), %			
10.63	10.51	10.460	0.0458	0.438	-1.63
	10.43				
	10.51				
	10.42				
	10.43				
2.13	2.16	2.148	0.0130	0.607	0.93
	2.15				
	2.14				
	2.16				
	2.13				
1.06	1.07	1.058	0.00837	0.791	-0.19
	1.05				
	1.06				
	1.05				
	1.06				

*SD – стандартное отклонение среднего результата.

**RSD – относительное стандартное отклонение среднего результата (коэффициент вариации).

***E – относительная ошибка отдельного определения.

телей (Kromasil® 100-5-C18 4.6 × 250 мм и Agilent Eclipse XDB-C18 5 мкм 4.6 × 250 мм). В результате исследования не было выявлено значительной разницы в величинах площадей пиков DTX (RSD суммарной выборки из равного количества измерений с использованием каждой колонки составило 0.72%), а также в критериях приемлемости хроматографической системы.

Особый интерес представляют результаты анализа полимерных композиций DTX, содержащих продукты его разложения. Основными посторонними примесями, образующимися в процессе воздействия гамма-радиации на композицию DTX, являются его изомеры, обладающие иной хроматографической подвижностью. Также было отмечено появление набора примесей, которых

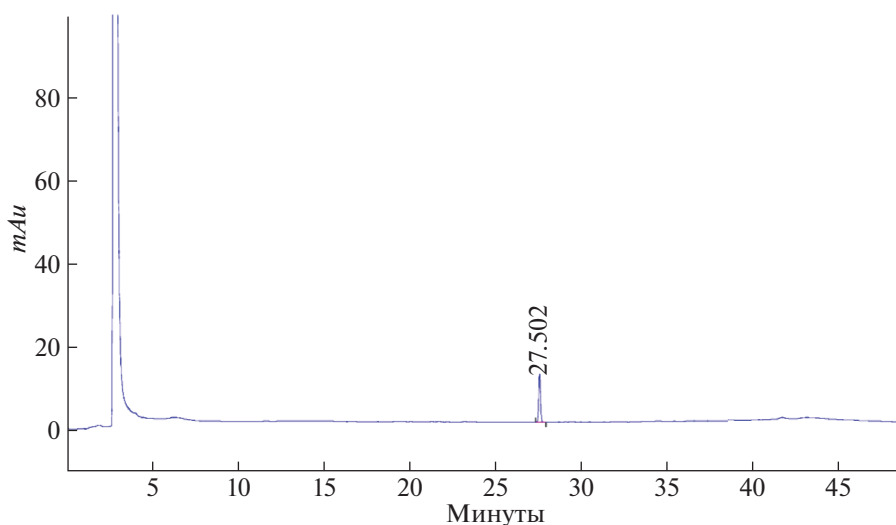


Рис. 7. Хроматограмма стандартного раствора доцетаксела в концентрации, соответствующей пределу количественного определения.

не было в исходной субстанции и в продукте (ПКМПП-Д) [18]. Согласно полученным данным ДТХ в составе изучаемой полимерной композиции достаточно стабилен и не подвержен деградации в процессе пробоподготовки.

Достигнутые значения параметров валидации хроматографической методики в полной мере удовлетворяли требованиям нормативных документов [20, 21]. Таким образом, подтверждены правильность подхода к выбору и разработке аналитической методики, а также ее эффективность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена разработка методики определения доцетаксела с помощью метода ВЭЖХ-УФ в композиции на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащей производное фолиевой кислоты. Хроматографическая методика была валидирована в соответствии с требованиями ГФ XIV (ОФС.1.1.0012.15). Подтвержденный аналитический диапазон методики составил от 4.25 до 425.06 мкг/мл ДТХ в растворе. По всем валидационным характеристикам методика соответствует критериям приемлемости и пригодна для контроля качества полученных образцов полимерной композиции ДТХ по показателю “количественное определение”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cortes J.E., Pazdur R. // J. Clin. Oncol. 1995. V. 13. № 10. P. 2643. <https://doi.org/10.1200/JCO.1995.13.10.2643>
2. Product Monograph Taxotere® (docetaxel for injection). Sanofi-Aventis Canada Inc. Laval (Québec), 2017. 62 p.
3. Большой справочник лекарственных средств / Под ред. Зиганшиной Л.Е. и др. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. С. 914.
4. Montero A., Fossella F., Hortobagyi G., Valero V. // Lancet Oncol. 2005. V. 6. № 4. P. 229. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70094-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70094-2)
5. Elm'hadi C., Tanz R., Khmamouche M.R. et al. // SpringerPlus. 2016. V. 5. № 1. P. 732. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2351-x>
6. Tan Q., Xiuju Liu X., Xinyu Fu X. et al. // Expert Opin. Drug Deliv. 2012. V. 9. № 8. P. 975. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.696606>
7. Low P.S., Kularatne S.A. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2009. V. 13. № 3. P. 256. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.022>
8. Elnakat H., Ratnam M. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2004. V. 56. № 8. P. 1067. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.01.001>
9. Esmaeili F., Ghahremani M.H., Ostad S.N. et al. // J. Drug Target. 2008. V. 16. № 5. P. 415. <https://doi.org/10.1080/10611860802088630>
10. Murugesan S., Mishra P., Jain N.K. // Curr. Nanosci. 2008. V. 4. № 4. P. 402. <https://doi.org/10.2174/157341308786306152>
11. Makadia H.K., Siegel S.J. // Polymers (Basel). 2011. V. 3. № 3. P. 1377. <https://doi.org/10.3390/polym3031377>
12. Mirakabad F.S.T., Nejati-Koshki K., Akbarzadeh A. et al. // Asian Pac. J. Cancer Prev. 2014. V. 15. № 2. P. 517. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.2.517>
13. Kapoor D.N., Bhatia A., Kaur R. et al. // Ther. Deliv. 2015. V. 6. № 1. P. 41. <https://doi.org/10.4155/tde.14.91>
14. Полтавец Ю.И., Воронцов Е.А., Заварзина В.В. и др. // Пат. РФ № 2675810. 19.12.2017.
15. Poltavets Y.I., Zavarzina V.V., Kuznetsov S.L. et al. // J. Reports Pharm. Sci. 2019. V. 8. № 2. P. 253. https://doi.org/10.4103/jrptps.JRPTPS_64_19
16. Poltavets Y.I., Zhirnik A.S., Zavarzina V.V. et al. // Cancer Nanotechnology. 2019. V. 10. P. 2. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0048-x>
17. Крашенинникова А.А., Заварзина В.В., Панова Д.С. и др. // Российский биотерапевтический журнал. 2020. Т. 19. № 2. С. 55. <https://doi.org/10.17650/1726-9784-2019-19-2-55-64>
18. Полтавец Ю.И., Алешин С.В., Заварзина В.В. и др. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2020. Т. 9. № 1. С. 66. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-1-66-74>
19. 07/2012:2449 Docetaxel Trihydrate // European Pharmacopoeia. The 8th Edition. 2013. V. 2. P. 2092.
20. ОФС.1.1.0012.15 “Валидация аналитических методик” // Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. Т. 1. М. 2018. С. 276.
21. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005. 13 p.